

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年12 月15 日 (15.12.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/118812 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/31, 15/53, 1/21,
A01H 5/00, C12P 23/00 // C12N 9/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/009609

(22) 国際出願日: 2005 年5 月26 日 (26.05.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-166625 2004 年6 月4 日 (04.06.2004) JP

(74) 代理人: 野村 健一 外(NOMURA, Kenichi et al.); 〒
2210835 神奈川県横浜市中区鶴屋町3丁目30番
の1 農機館4階 Kanagawa (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株
式会社海洋バイオテクノロジー研究所 (MARINE
BIOTECHNOLOGY INSTITUTE CO., LTD.) [JP/JP];
〒0260001 岩手県釜石市平田第3地割75番1 Iwate
(JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 崔 善江 (CHOI,
Seon-Kang) [JP/JP]; 〒0260001 岩手県釜石市平田第
3地割75番1 株式会社海洋バイオテクノロジー
研究所内 Iwate (JP). 三沢 典彦 (MISAWA, Norihiko)
[JP/JP]; 〒0260001 岩手県釜石市平田第3地割75番
1 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所内 Iwate
(JP).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PRODUCING ASTAXANTHIN OR METABOLIC PRODUCT THEREOF BY USING CAROTENOID
KETOLASE AND CAROTENOID HYDROXYLASE GENES

(54) 発明の名称: カロテノイドケトララーゼ及びカロテノイドヒドロキシラーゼ遺伝子を利用したアスタキサンチン
またはその代謝物の製造法

(57) Abstract: It is intended to provide a microorganism or a plant having β -ionone ring-4-ketolase gene and/or β -ionone ring-3-
hydroxylase, which are obtained from *Brevundimonas* sp. SD-212 strain, transferred thereinto. Since β -ionone ring-4-ketolase
and β -ionone ring-3-hydroxylase produced by *Brevundimonas* sp. SD-212 strain show higher activities than the existing enzymes,
astaxanthin can be efficiently produced by using a microorganism or the like into which genes encoding these enzymes have been
transferred.

(57) 要約: プレバンディモナス属SD-212株から得られた β -イオノン環-4-ケトララーゼ遺伝子及び/又は β -イオノ
ン環-3-ヒドロキシラーゼを導入した微生物又は植物を提供する。プレバンディモナス属SD-212株が産生する β -イ
オノン環-4-ケトララーゼ及び β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼは、従来の酵素よりも高い活性を示すので、これら
の酵素をコードする遺伝子を導入した微生物等によって効率的なアスタキサンチンの製造が可能になる。

WO 2005/118812 A1

明 細 書

カロテノイドケトラゼ及びカロテノイドヒドロキシラーゼ遺伝子を利用した
アスタキサンチンまたはその代謝物の製造法

技術分野

[0001] 本発明は、 β -イオノン環(β 環)を有するカロテノイドの4位(4'位)のメチレン基をケト基に変換するオキシゲナーゼ遺伝子、及び、 β -イオノン環(β 環)を有するカロテノイドの3位(3'位)の炭素に水酸基を導入するヒドロキシラーゼ遺伝子が導入された微生物または植物を利用したアスタキサンチンまたはその代謝物の製造法に関するものである。

背景技術

[0002] カロテノイド(carotenoid、カロチノイドとも呼ばれる)は、炭素鎖が40のイソプレン骨格からなる自然界に豊富に存在する色素の総称である。現在までに600種以上のカロテノイドが単離されている(Pfander, H., ed., Key to Carotenoids, Basel, Birkhauser, 1987)。最近ではカロテノイドの持つ種々の癌(がん)等の慢性病に対する予防効果が注目されており、数多くの報告がなされている(たとえば、西野輔翼, 村越倫明, 矢野昌充, Food Style 21, 4, 53-55, 2000; Nishino, H. et al, Carotenoids in cancer chemoprevention. Cancer Metastasis Rev. 21, 257-264, 2002; Mayne, S.T., β -Carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. FASEB J., 10, 690-701, 1996 参照)。その中でもアスタキサンチン(astaxanthin)は、健康食品原料として最近、特に注目を集めているカロテノイドである(魚舩隆敏, 史上最強のカロテノイド「アスタキサンチン」の抗酸化作用とがん転移抑制効果, Food Style 21, 4, 70-75, 2000)。活性酸素の1種である一重項酸素の消去能に関してin vitroの評価系では、アスタキサンチンは、ビタミンEの500倍、 β -カロテンの40倍、リコペンの10倍の効果を有している。また、ヒトの疫学・臨床試験において、アスタキサンチンは血中のLDLの酸化を抑制することにより、動脈硬化を抑制することが明らかにされている(前述の文献:魚舩隆敏, Food Style 21, 4, 70-75, 2000)。また、アスタキサンチンは、NK細胞の活性の亢進、白内障や黄斑変性症の予防、膀胱がん等がんの予防に効果があることが明

らかにされつつある(前述の文献:魚躬隆敏, Food Style 21, 4, 70-75, 2000; Tanaka, T. et al, Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. Carcinogenesis 15, 15-19, 1994)。

[0003] アスタキサンチンは、工業的には、オキアミやアメリカザリガニなどの甲殻類から抽出されており、また、アスタキサンチン産生緑藻Haematococcus pluvialisの培養物からも抽出されている。しかしながら、前者の場合は色素濃度の均一性や原料特有の臭気などの品質的問題および低収率から来るコスト高などにより、後者の場合は中温、中性での長期間培養から来る供給の不安定性などにより、安価な安定的供給に至っていないのが現状である。したがって、アスタキサンチンを安価に安定的に供給することができれば、ヒトの健康への好影響に関する種々の生理試験を新たに実施することも可能になり、現在の健康食品市場を大きく拡大することができると思われる。

[0004] 上記の目的を達成するには、遺伝子組換え技術により、代謝工学的にアスタキサンチンを高生産するようになった微生物や植物を作出し、これらによるアスタキサンチンの製造・販売が考えられる。微生物や植物にアスタキサンチンを生産させるのに必要な遺伝子はすでに取得されており、それらを利用して、本来はカロテノイドを作らない細菌や酵母等の微生物や、植物の特殊な器官にアスタキサンチンを合成させることはすでに可能になっている(非特許文献1; Miura, Y., Kondo, K., Saito, T., Shimada, H., Fraser, P. D., and Misawa, N., Production of the carotenoids, lycopene, β -carotene, and astaxanthin in the food yeast Candida utilis. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1226-1229, 1998; Mann, V., Harker, M., Pecker, I., and Hirschberg, J., Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. Nat. Biotechnol. 18, 888-892, 2000)。しかしながら、アスタキサンチンまでの合成に必要な遺伝子をすべて導入し発現させても、最終産物のアスタキサンチンに加えて、アスタキサンチンの合成中間体が多く貯まるのが現状であった。これらは、 β -カロテンからアスタキサンチンまでの経路における合成中間体のカロテノイドであり(図1参照)、この経路がアスタキサンチン合成の律速段階である。組換え大腸菌を用いた例では、最終産物のアスタキサンチン(36~50%)に加えて、アドニキサンチン(adonixanthin; 4-ケトゼアキサン

チン)、アドニルビン(adonirubin; フェニコキサンチン)、カンタキサンチン(canthaxanthin)、3-ヒドロキシエキネノン(3-hydroxyechinenone)、3'-ヒドロキシエキネノン(3'-hydroxyechinenone)等の合成中間体が検出された(非特許文献1)。最近、緑藻Haematococcus pluvialis由来の β -イオン環-4-ケトラーゼ(β -C4-ketolase)遺伝子(crtO)がシロイヌナズナ(Arabidopsis)に導入され、その種子で発現されたが、生成した主要なカロテノイドはすべて、アスタキサンチンの合成中間体(アドニルビンやカンタキサンチン等)であった。 β -カロテンからアスタキサンチン合成までの経路は、2つの酵素、すなわち、 β -イオン環-3-ヒドロキシラーゼ(β -C3-hydroxylase)(CrtZ)と β -イオン環-4-ケトラーゼ(β -C4-ketolase)(CrtW, CrtO, またはBkt)によって担われることがわかっている(図1参照)。アスタキサンチンの高生産のためには、この2つの酵素の効率化が望まれていた。たとえば、 β -イオン環-4-ケトラーゼは、アドニキサンチンからアスタキサンチンへの変換効率が特に悪く、多くの場合、アドニキサンチンが蓄積されることがわかっていた(非特許文献2; Yokoyama, A. and Miki, W., Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium Agrobacterium aurantiacum. FEMS Microbiol. Lett. 128, 139-144, 1995)。

[0005] 非特許文献1: Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwar, S., Saito, T., Ohtani, T., and Miki, W., Structure and functional analysis of a marine bacteria l carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol. 177, 6575-6584, 1995

非特許文献2: Fraser, P. D., Shimada, H., and Misawa, N., Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay. Eur. J. Biochem. 252, 229-236, 1998

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の課題は、 β -イオン環の4位のメチレン基をケト基に変換する酵素[β -イオン環-4-ケトラーゼ(β -C4-ketolase); カロテノイド 4,4'- β -オキシゲナーゼ(carotenoid 4,4'- β -oxygenase)]や β -イオン環の3位の炭素に水酸基を導入する酵

素[β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ(β -C3-hydroxylase);カロテノイド 3,3'- β -ヒドロキシラーゼ(carotenoid 3,3'- β -hydroxylase)]をコードする遺伝子を導入・発現させた組換え微生物や植物を利用した、アスタキサンチンやその代謝物の効率的な製造法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、海洋細菌ブレバンディモナス属(*Brevundimonas* sp.)SD-212株(SD 212株;MBIC 03018)がアスタキサンチンやその代謝物を作ることができるにもかかわらず、未だカロテノイド生合成酵素の性質が明らかにされていないことに着目した。鋭意研究を重ねた結果、本海洋細菌よりクローニングされた、 β -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に変換するオキシゲナーゼ[CrtW: β -イオノン環-4-ケトラーゼ(β -C4-ketolase);カロテノイド 4,4'- β -オキシゲナーゼ(carotenoid 4,4'- β -oxygenase)]がアドニキサンチンから効率的にアスタキサンチンを合成できる酵素であることを見出した。さらに、本発明者らは、本海洋細菌よりクローニングされた、 β -イオノン環の3位の炭素に水酸基を導入するヒドロキシラーゼ[CrtZ: β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ(β -C3-hydroxylase);カロテノイド 3,3'- β -ヒドロキシラーゼ(carotenoid 3,3'- β -hydroxylase)]が、他細菌由来の同酵素(CrtZ)より、アスタキサンチンの合成を効率的に行う酵素であることを見出した。

[0008] まず、ブレバンディモナス属SD-212株の染色体DNAを用いて、大腸菌におけるコスミドライブラリーを作製した。次に、フィトエンデサチュラーゼ(*crtI*)遺伝子がカロテノイド産生細菌間で2つの保存領域を有していることを見出し、PCR用プライマーを設計した。このプライマーを用いて、ブレバンディモナス属SD-212株の染色体DNAを鋳型としたPCRを行ったところ、1.1 kbのDNA断片が増幅された。この配列の塩基配列を決定したところ、*crtI*の部分配列であることがわかった。この*crtI*部分配列断片をプローブとして、SD-212株のコスミドライブラリーを用いたコロニーハイブリダイゼーション(colony hybridization)法を行ったところ、数個の陽性コロニーが得られた。陽性コロニーからプラスミドDNAを調製し、サザンハイブリダイゼーション(Southern hybridization)法を行い、陽性の12 kbのEcoRIのDNA断片を得た。この12 kbのEcoRI断片の塩基配列を決定したところ、この断片内にカロテノイド生合成遺伝子群[*crtW*と*crtZ*を含

む既存のcrt遺伝子(6個)及びidi遺伝子(1つ)とホモロジーがあるORF(オープンリーディングフレーム、open reading frame)が7つ]が存在することが明らかとなった。次に、本細菌由来のcrtW遺伝子を、大腸菌ベクターpUC18におけるlac遺伝子のプロモータの利用とLacZのリーダ配列を利用した融合タンパク質法により大腸菌で強制発現させるためのコンストラクトを作製した。コントロールとして、パラコッカス属細菌由来の2種類のcrtW遺伝子も同様にコンストラクトを作製した。そして、エルウィニア属細菌のcrt遺伝子群(crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ)の利用によりゼアキサンチンを産生する大腸菌を宿主として、各種CrtWの機能の比較を行った。その結果、ブレバンディモナス属SD-212株由来のCrtWがアドニキサンチンからアスタキサンチンを効率的に変換できる酵素であり、その結果としてアスタキサンチンを効率的に合成できることを突き止めた。さらに、本細菌由来のcrtZ遺伝子を、大腸菌ベクターpUC18におけるlac遺伝子のプロモータの利用とLacZのリーダ配列を利用した融合タンパク質法により大腸菌で強制発現させるためのコンストラクトを作製した。コントロールとして、パラコッカス属細菌由来の2種類のcrtZ遺伝子も同様にコンストラクトを作製した。さらにコントロールとして、エルウィニア属細菌及びフラボバクテリウム属P99-3株由来のcrtZも同様にコンストラクトを作製した。ただし、後者のP99-3株のcrtZの場合は、pUC18の代わりにpUC8を用いた。そして、エルウィニア属細菌のcrt遺伝子群(crtE, crtB, crtI, crtY)及びパラコッカス属細菌のcrtW遺伝子の利用によりカンタキサンチンを産生する大腸菌を宿主として、各種CrtZの機能の比較を行った。その結果、ブレバンディモナス属SD-212株由来のCrtZを用いた場合がアスタキサンチンの生産量が最も多いこと、すなわち、本CrtZがアスタキサンチンを最も効率的に合成できることを突き止め、本発明を完成するに至ったのである。

[0009] 即ち、本発明は、以下の(1)～(12)を提供するものである。

[0010] (1) (a) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるペプチド、(b) 配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-4-ケトラゼ活性を有するペプチド、又は(c) 配列番号1記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノ

ン環-4-ケトラゼ活性を有するペプチドをコードする β -イオノン環-4-ケトラゼ遺伝子を導入して得られる微生物または植物であって、アスタキサンチンまたはその代謝物を合成できる微生物または植物。

- [0011] (2) β -イオノン環-4-ケトラゼ遺伝子を、他のカロテノイド生合成遺伝子とともに導入して得られる(1)に記載の微生物または植物。
- [0012] (3) 他のカロテノイド生合成遺伝子が、ファルネシルピロリン酸から、3位が水酸化された β -イオノン環を有するカロテノイドを合成するのに必要とされる遺伝子群の全部又は一部であることを特徴とする(2)に記載の微生物または植物。
- [0013] (4) 微生物が大腸菌であることを特徴とする上記(1)乃至(3)に記載の微生物。
- [0014] (5) (1)乃至(4)に記載の微生物を、培地で培養して培養物又は菌体からアスタキサンチンまたはその代謝物を得ることを特徴とする、アスタキサンチンまたはその代謝物の製造法。
- [0015] (6) (1)乃至(3)に記載の植物を、栽培して植物体からアスタキサンチンまたはその代謝物を得ることを特徴とする、アスタキサンチンまたはその代謝物の製造法。
- [0016] (7) (d)配列番号10記載のアミノ酸配列からなるペプチド、(e)配列番号10記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド、又は(f)配列番号9記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチドをコードする β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ遺伝子を導入して得られる微生物または植物であって、アスタキサンチンまたはその代謝物を合成できる微生物または植物。
- [0017] (8) β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ遺伝子を、他のカロテノイド生合成遺伝子とともに導入して得られる(7)に記載の微生物または植物。
- [0018] (9) 他のカロテノイド生合成遺伝子が、ファルネシルピロリン酸から、4位がケト化された β -イオノン環を有するカロテノイドを合成するのに必要とされる遺伝子群の全部又は一部であることを特徴とする(8)に記載の微生物または植物。
- [0019] (10) 微生物が大腸菌であることを特徴とする(7)乃至(9)に記載の微生物。

[0020] (11) (7)乃至(10)に記載の微生物を、培地で培養して培養物又は菌体からアスタキサンチンまたはその代謝物を得ることを特徴とする、アスタキサンチンまたはその代謝物の製造法。

[0021] (12) (7)乃至(9)に記載の植物を、栽培して植物体からアスタキサンチンまたはその代謝物を得ることを特徴とする、アスタキサンチンまたはその代謝物の製造法。

[0022] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0023] 1. 遺伝子源の海洋細菌ブレバンディモナス属SD-212 株(MBIC 03018)

目的とする遺伝子の供給源となった海洋細菌ブレバンディモナス属(*Brevundimona* sp.) SD-212 株(SD212; MBIC 03018)は、火山列島の海水中より単離された α -プロテオバクテリアであり、GC含量は67.1 (mol)%である。本海洋細菌が作るカロテノイドは、アスタキサンチン、2-ヒドロキシアスタキサンチン(2-hydroxyastaxanthin)や2-ヒドロキシアドニキサンチン(2-hydroxyadanixanthin)等であることが(株)海洋バイオテクノロジー研究所の横山らにより報告されている(Yokoyama, A., Miki, W., Izumida, H., and Shizuri, Y., New trihydroxy-keto-carotenoids isolated from an astaxanthin-producing marine bacterium. Biosci. Biotech. Bioche. 60, 200-203, 1996参照)。なお、本細菌は、MBIC 03018として(株)海洋バイオテクノロジー研究所より公開・分譲されている。また、本細菌の16S rDNA配列と*gvtB*遺伝子配列はそれぞれ、アクセッション番号AB016849、AB014993としてGenBank/DDBJに登録されている。

[0024] 2. β -イオノン環-4-ケトラゼをコードする遺伝子

本発明は、以下の(a)、(b)、又は(c)に示すペプチドをコードする遺伝子(以下、この遺伝子を「本発明の*crtW*遺伝子」という場合がある。)を利用する。

[0025] (a) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

[0026] (b) 配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-4-ケトラゼ活性を有するペプチド。

[0027] (c) 配列番号1記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノン環-4-ケトラゼ活性を有するペプチド。

- [0028] (a)のペプチドは、ブレバンディモナス属SD-212株から得られた β -イオノン環-4-ケトラゼ活性を有する244個のアミノ酸配列からなるペプチド(CrtWとも呼ぶ)である。
- [0029] (b)のペプチドは、(a)のペプチドに、効率的な β -イオノン環-4-ケトラゼ活性を失わせない程度の変異が導入されたペプチドである。このような変異は、自然界において生じる変異のほかに、人為的な変異をも含む。人為的変異を生じさせる手段としては、部位特異的変異誘発法(Nucleic Acids Res. 10, 6487-6500, 1982)などを挙げることができるが、これに限定されるわけではない。変異したアミノ酸の数は、 β -イオノン環-4-ケトラゼ活性を失わせない限り、その個数は制限されないが、通常は、20アミノ酸以内であり、好ましくは10アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内である。
- [0030] (c)のペプチドは、DNA同士のハイブリダイゼーションを利用することにより得られる細菌由来の β -イオノン環-4-ケトラゼ活性を有するペプチドである。(c)のペプチドにおける「ストリンジェントな条件」とは、特異的なハイブリダイゼーションのみが起き、非特異的なハイブリダイゼーションが起きないような条件をいう。このような条件は、通常、「 $0.5 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 42°C 」程度であり、好ましくは「 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 65°C 」程度である。ハイブリダイゼーションにより得られるDNAは、配列番号1記載の塩基配列により表されるDNAと通常高い相同性を有する。高い相同性とは、75%以上の相同性、好ましくは90%以上の相同性を指す。
- [0031] 本発明のcrtW遺伝子は、例えば、以下のようにして得ることができる。まず、海洋細菌ブレバンディモナス属SD-212株のコスミドライブラリーを大腸菌において作製する。次に、実施例6に示したようなカロテノイド生合成遺伝子の相同配列を利用したコロニーハイブリダイゼーション法やPCRクローニング法により得ることができる。
- [0032] 3. β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼをコードする遺伝子
本発明は、以下の(d)、(e)、又は(f)に示すペプチドをコードする遺伝子(以下、この遺伝子を「本発明のcrtZ遺伝子」という場合がある。)を利用する。
- [0033] (d)配列番号10記載のアミノ酸配列からなるペプチド。
- [0034] (e)配列番号10記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠

失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド。

[0035] (f)配列番号9記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼを有するペプチド。

[0036] (d)のペプチドは、ブレバンディモナス属SD-212株から得られた β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ活性を有する161個のアミノ酸配列からなるペプチド(CrtZとも呼ぶ)である。

[0037] (e)のペプチドは、(d)のペプチドに、効率的な β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ活性を失わせない程度の変異が導入されたペプチドである。「変異」の意味は、前述した本発明のcrtW遺伝子の場合と同様である。

[0038] (f)のペプチドは、DNA同士のハイブリダイゼーションを利用することにより得られる細菌由来の β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチドである。(f)のペプチドにおける「ストリンジェントな条件」の意味は、前述した本発明のcrtW遺伝子の場合と同様である。

[0039] 本発明のcrtZ遺伝子は、例えば、以下のようにして得ることができる。まず、海洋細菌ブレバンディモナス属SD-212株のコスミドライブラリーを大腸菌において作製する。次に、実施例6に示したようなカロテノイド生合成遺伝子の相同配列を利用したコロニーハイブリダイゼーション法やPCRクローニング法により得ることができる。

[0040] なお、本発明のcrtW遺伝子及びcrtZ遺伝子は、ブレバンディモナス属SD-212株のカロテノイド生合成遺伝子群を含む12 kb EcoRI DNA断片中に含まれており、このDNA断片が大腸菌ベクターpBluescript II KS-に挿入されたプラスミドp5Bre2-15を有する大腸菌は受託番号P-19580として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

[0041] 4. アスタキサンチンまたはその代謝物を生産する微生物または植物

本発明には、2に記載の本発明のcrtW遺伝子を導入して得られる微生物または植物、及び、3に記載の本発明のcrtZ遺伝子を導入して得られる微生物または植物を含む。微生物または植物には、本発明の遺伝子だけでなく、他のカロテノイド生合成

遺伝子も導入する場合が多いが、微生物 または植物で発現させたい器官がもともと基質となるカロテノイドを生産している場合には、他のカロテノイド生合成遺伝子を導入する必要はないか、或いは一部のみ導入すればよい。

[0042] 宿主とする微生物は大腸菌を例示できるが、これ以外の微生物であってもよい。宿主とする植物はナタネを例示できるが、これ以外の植物であってもよい。

[0043] 他のカロテノイド生合成遺伝子は、通常、ファルネシルピロリン酸 (FPP) から β -カロテン (β -carotene) を合成するのに必要とされる遺伝子群の全部または一部を含む。このような遺伝子群の具体例としては、FPP からゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を合成する酵素遺伝子 crtE、2分子の GGPP からフィトエン (phytoene) を合成する遺伝子 crtB、フィトエン からリコペン (lycopene) を合成する遺伝子 crtI、リコペン から β -カロテン (β -carotene) を合成する遺伝子 crtY (通常、エルウィニア属細菌由来のもの) 等を例示できる。 β -カロテン からアスタキサンチン を合成するには、本発明の crtW 遺伝子と crtZ 遺伝子の両方を用いるのが好ましいが、片方のみを用いることも可能である。本発明の crtW 遺伝子のみを用いる場合は、 β -カロテン に 3 (3')-ヒドロキシ基を導入する他生物由来の crtZ 遺伝子 (通常、エルウィニア属細菌またはパラコッカス属細菌由来のもの) またはそれと同等の遺伝子を用いる必要がある。本発明の crtZ 遺伝子のみを用いる場合は、 β -カロテン の 4 (4') 位にケト基を導入する他生物由来の crtW 遺伝子 (通常、パラコッカス属細菌由来のもの) またはそれと同等の遺伝子を用いる必要がある。

[0044] これら他のカロテノイド生合成遺伝子群のすべて又は一部を適当な発現ベクターに挿入し、発現させたい微生物に導入すれば、その組換え微生物は、 β -イオノン環を有するカロテノイド (β -カロテン またはその代謝物)、または 3-ヒドロキシ- β -イオノン環を有するカロテノイド (ゼアキサンチン またはその代謝物)、または 4-ケト- β -イオノン環を有するカロテノイド (カンタキサンチン またはその代謝物) を作るようになる (基質の FPP はすべての微生物が作ることができる。GGPP も微生物によっては合成量が少ないものもあるが、すべての微生物が作ることができる)。

[0045] また、上記の遺伝子群の一部を、発現させたい器官で発現するプロモータ (たとえば、種での発現にはナピンプロモータ) と葉緑体等プラスチドへの移行ペプチド (tran

sit peptide;たとえば、Rubiscoの小サブユニットの移行ペプチド)を利用して適当な植物用ベクターに挿入し、植物に導入すれば、その組換え植物は β -イオノン環を有するカロテノイド(β -カロテンまたはその代謝物)、または3-ヒドロキシ- β -イオノン環を有するカロテノイド(ゼアキサンチンまたはその代謝物)、または4-ケト- β -イオノン環を有するカロテノイド(カンタキサンチンまたはその代謝物)を作るようになる。通常、ナタネの種など植物のカロテノイドを産生する器官は β -イオノン環を有するカロテノイドを作るのに必要な大部分の遺伝子を有している場合が多いが、crtB遺伝子の導入・発現がカロテノイドの生産量全体を上げる可能性が高い(Shewmaker, C.K. et al, Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. Plant J. 20, 401-412, 1999)。

- [0046] 以上のようにして作製された、 β -イオノン環を有するカロテノイド(β -カロテンまたはその代謝物)、または3-ヒドロキシ- β -イオノン環を有するカロテノイド(ゼアキサンチンまたはその代謝物)、または4-ケト- β -イオノン環を有するカロテノイド(カンタキサンチンまたはその代謝物)の生産能のある微生物または植物に、本発明のcrtW遺伝子及び/又はcrtZ遺伝子(植物の場合は、前述の移行ペプチド配列をN末配列に付ける必要がある)をさらに導入・発現させれば、その微生物または植物は、 β -カロテンにおける4位(4'位)のメチレン基がケト基に変換され且つ3位(3'位)の炭素に水酸基が導入されたカロテノイドであり、また、ゼアキサンチンにおける4位(4'位)のメチレン基がケト基に変換されたカロテノイドでもあり、また、カンタキサンチンにおける3位(3'位)の炭素に水酸基が導入されたカロテノイドでもあるアスタキサンチンや、内在のアスタキサンチン代謝酵素により変換されたアスタキサンチン代謝物(たとえば、2-ヒドロキシアスタキサンチンやアスタキサンチンのエステル体)を作るようになる。
- [0047] 大腸菌や酵母等の種々の微生物のベクターの情報や外来遺伝子の導入・発現法は、多くの実験書に記載されているので(たとえば、Sambrook, J., Russel, D. W., Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Edition, CSHL Press, 2001)、それらに従ってベクターの選択、遺伝子の導入、発現を行うことができる。
- [0048] 植物のベクターの情報や外来遺伝子の導入・発現法も、多くの実験書に記載されているので(たとえば、石田功、三沢典彦、細胞工学実験操作入門、講談社サイエン

ティフィク、1992)、それらに従ってベクターの選択、遺伝子の導入、発現を行うことができる。

[0049] 4. アスタキサンチンまたはその代謝物の製造法

本発明は、上記に記載の微生物を、培地で培養して培養物又は菌体から、アスタキサンチンやその代謝物を得ることを特徴とする、効率的なアスタキサンチンやその代謝物の製造法を提供する。さらに、本発明には、上記に記載の植物を栽培して、種等の器官からアスタキサンチンやその代謝物を得ることを特徴とする、効率的なアスタキサンチンやその代謝物の製造法を提供する。

[0050] アスタキサンチンの代謝物とは、2-ヒドロキシアスタキサンチンやアスタキサンチンのエステル体などを例示できるが、これらに限定されるわけではない。また、アスタキサンチン代謝物が存在しない場合もある。

[0051] 本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を表す。

[0052] 配列番号1:ブレバンディモナス属SD-212株のcrtW遺伝子の配列及びそれがコードするアミノ酸配列。

[0053] 配列番号2:ブレバンディモナス属SD-212株のcrtW遺伝子がコードするアミノ酸配列。

[0054] 配列番号3:ブレバンディモナス属SD-212株由来のcrtWの増幅用のプライマー(フォワード)

配列番号4:ブレバンディモナス属SD-212株由来のcrtWの増幅用のプライマー(リバース)

配列番号5:パラコッカス属細菌PC1株由来のcrtWの増幅用のプライマー(フォワード)

配列番号6:パラコッカス属細菌PC1株由来のcrtWの増幅用のプライマー(リバース)

配列番号7:パラコッカス属細菌N81106株由来のcrtWの増幅用のプライマー(フォワード)

配列番号8:パラコッカス属細菌N81106株由来由来のcrtWの増幅用のプライマー(リバース)

配列番号9:ブレバンディモナス属SD-212株のcrtZ遺伝子の配列及びそれがコード

するアミノ酸配列。

[0055] 配列番号10:ブレバンディモナス属SD-212株のcrtZ遺伝子がコードするアミノ酸配列。

[0056] 配列番号11:ブレバンディモナス属SD-212株由来のcrtZの増幅用のプライマー(フォワード)

配列番号12:ブレバンディモナス属SD-212株由来のcrtZの増幅用のプライマー(リバーズ)

配列番号13:エルウィニア・ウレドボラ由来のcrtZの増幅用のプライマー(フォワード)

配列番号14:エルウィニア・ウレドボラ由来のcrtZの増幅用のプライマー(リバーズ)

配列番号15:パラコッカス属細菌PC1株由来のcrtZの増幅用のプライマー(フォワード)

配列番号16:パラコッカス属細菌PC1株由来のcrtZの増幅用のプライマー(リバーズ)

配列番号17:パラコッカス属細菌N81106株由来のcrtZの増幅用のプライマー(フォワード)

配列番号18:パラコッカス属細菌N81106株由来由来のcrtZの増幅用のプライマー(リバーズ)

配列番号19:フラボバクテリウム属P99-3株由来のcrtZの増幅用のプライマー(フォワード)

配列番号20:フラボバクテリウム属P99-3株由来由来のcrtZの増幅用のプライマー(リバーズ)

発明の効果

[0057] 本発明により、ブレバンディモナス属SD-212株のcrtW遺伝子及び／又はcrtZ遺伝子を利用して、アスタキサンチンやその代謝物を大量に製造できるようになる。

図面の簡単な説明

[0058] [図1]アスタキサンチン産生大腸菌におけるアスタキサンチン生合成経路と各種Crt酵素の機能を示す図。

[図2]ブレバンディモナス属SD-212のカロテノイド生合成遺伝子群の構造を示す図。

[図3]各種組換え大腸菌(IPTG添加後48時間培養)に蓄積した色素のHPLC-PDA分

析の結果を示す図(図中の1はアスタキサンチン、2はアドニキサンチン、3はアドニルビン、4はゼアキサンチン、5は3'-ヒドロキシエキネノン、6は3-ヒドロキシエキネノン、7はリコペンのピークをそれぞれ示す。)。a) JM109Ercrt-zeaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。b) JM109BreW-astaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。c) JM109ParaPC1W-astaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。d) JM109ParaN8W-astaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。

[図4]各種組換え大腸菌によるアスタキサンチン蓄積量の培養時間による変動を示す図。

[図5]各種組換え大腸菌(IPTG添加後6時間培養)に蓄積した色素のHPLC-PDA分析の結果を示す図。a) JM109BreW-astaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。b) JM109ParaPC1W-astaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。c) JM109ParaN8W-astaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。

[図6]各種組換え大腸菌(IPTG添加後48時間培養)に蓄積した色素のHPLC-PDA分析の結果を示す図(図中の1はアスタキサンチン、2はアドニキサンチン、3はアドニルビン、4はカンタキサンチンのピークをそれぞれ示す。)。a) JM109Pancrt-Canthaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。b) JM109BreZ-astaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。c) JM109PanZ-astaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。d) JM109ParaPC1Z-astaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。e) JM109ParaN8Z-astaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。f) JM109P99Z-astaの産生色素のHPLCクロマトグラム(470 nm)。

[図7]各種組換え大腸菌によるアスタキサンチン蓄積量の培養時間による変動を示す図。

発明を実施するための最良の形態

[0059] 以下、実施例により本発明について具体的に説明する。もともと、本発明はこれにより限定されるものではない。

実施例

[0060] [実施例1] 菌株、プラスミド、生育条件

本発明(crtW)に用いられた菌株とプラスミドを表1に示す。菌株の培養は37℃ある

いは30℃でLB (Luria-Bertani) 培地を用いて行った。必要に応じて、アンピシリン (ampicillin; Ap, 100 μ g/ml) または、クロラムフェニコール (chloramphenicol; Cm, 30 μ g/ml) を培地に添加した。

[0061] [表1]

本発明に用いた菌株とプラスミド		
菌株/プラスミド	性質*	文献/発元
菌株		
<i>E. coli</i> JM109	遺伝子操作実験用宿主	Takara
JM109Ercrt-zea	pACCAR25 Δ crtX を大腸菌 JM109 に導入したもの	本発明
JM109BreW-asta	pACCAR25 Δ crtX と pUCBreW を JM109 に導入したもの	本発明
JM109ParaPC1W-asta	pACCAR25 Δ crtX と pUCParaPC1W を JM109 に導入したもの	本発明
JM109ParaN8W-asta	pACCAR25 Δ crtX と pUCParaN8W を JM109 に導入したもの	本発明
プラスミド		
pACCAR25 Δ crtX	Cm ^r , crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ を含むプラスミド	Misawa et al, 1995
pUC18	Ap ^r , クローニングベクター	TOYOBO
p5Bre2-15	Ap ^r , <i>Brevundimonas</i> sp. SD-212 (MBIC03018) 株由来の 12 kb の <i>Eco</i> RI 断片 (カロテノイド生成遺伝子群を含む) が pBluescript II KS-の <i>Eco</i> RI 部位に挿入されたもの	本発明
pPC17	Ap ^r , <i>Paracoccus</i> sp. PC-1 (MBIC03024) 株由来の 1.63 kb の DNA 断片が pBluescript II SK+ の <i>Pst</i> I と <i>Pst</i> II 部位に挿入されたもの	Misawa et al, 1995
AK96K	Ap ^r , <i>Paracoccus</i> sp. N81106 (MBIC01143) 株由来の 1.88 kb の DNA 断片が pBluescript II SK- の <i>Bam</i> HI と <i>Kpn</i> I 部位に挿入されたもの	Misawa et al, 1995
pUCBreW	Ap ^r , <i>Brevundimonas</i> sp. SD-212 (MBIC03018) 株由来の β -carotene ketolase を PCR で増幅され、pUC18 に挿入されたもの	本発明
pUCParaPC1W	Ap ^r , <i>Paracoccus</i> sp. PC-1 (MBIC03024) 株由来の β -carotene ketolase を PCR で増幅され、pUC18 に挿入されたもの	本発明
pUCParaN8W	Ap ^r , <i>Paracoccus</i> sp. N81106 (MBIC01143) 株由来の β -carotene ketolase を PCR で増幅され、pUC18 に挿入されたもの	本発明

* Ap^r, ampicillin 耐性, Cm^r, chloramphenicol 耐性

Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T., and Miki, W. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol. 177: 6575-6585: 非特許文献1

[実施例2] 遺伝子操作実験

プラスミドの調製、制限酵素処理、ライゲーション反応、形質転換などの通常の遺伝子操作実験は、Sambrookら(1989)のMolecular Cloningに示された方法により行った。

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory

manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

〔実施例3〕 プレバンディモナス属SD-212株からの染色体DNAの調製

プレバンディモナス属 (*Brevundimonas* sp.) SD-212 株 (SD212; MBIC 03018) を300 mlのMarine Broth (MB) 培地 (Difco) で25℃、3日間培養した。菌体を集菌後、STE緩衝液 (100 mM NaCl, 10 mM Tris・HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) で二回洗浄し、68℃で15分間熱処理をした後、5 mg/ml のリゾチーム (Sigma) と100 μ g/mlのRNase A (Sigma)を含む液 (50 mM グルコース、25 mM Tris・HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁した。37℃で一時間インキュベートした後、250 μ g/mlになるようにProtenase K (Sigma)を加え、37℃で10分間インキュベートした。さらに最終濃度が1% になるようにN-Lauroylsarcosine・Naを添加し、転倒混和により穏やかに完全に混合した後37℃で3時間インキュベートした。さらにフェノール/クロロホルム抽出を数回行った後、2倍量のエタノールをゆっくりと添加しながら、析出してきた染色体DNAをガラス棒で巻きつけ、70% エタノールでリンスした後、2 mlのTE緩衝液 (10 mM Tris・HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解して、染色体DNA溶液とした。

〔実施例4〕 PCR法によるフィトエンデサチュラーゼ遺伝子(*crtI*)の部分断片の増幅

カロテノイド産生細菌間のフィトエンデサチュラーゼ (phytoene desaturase; フィトエン脱水素酵素) 遺伝子(*crtI*)の相同性を利用して得られた*crtI*-Foプライマー (5'-TTY GAY GCI GGI CCI ACI GT -3')、*crtI*-Reプライマー (5'-CCI GGR TGI GTI CCI GCI CC-3')を合成し、前出した方法により得られた、プレバンディモナス属SD-212株の染色体DNAを鋳型として用い、PCR法により増幅した。耐熱性DNAポリメラーゼはLa-Taq (TaKaRa)を用い、96℃で5分間熱変性後、98℃で20秒、58℃で30秒、72℃で1分の条件で35サイクルの増幅を行った。増幅産物は、1% アガロースゲル電気泳動で確認後、1.1 kbの長さのDNAをアガロースゲルから切り出し、精製 (Qiagen Gel Extraction kit, QIAGEN、もしくはGene Clean II Kit、BIO101)を行った。精製されたDNA断片は、pGEM-T Easyに連結し、大腸菌 (DH5 α) に形質転換した。このプラスミドをpCRTI-SD212と名づけ、アンピシリンを添加した2 mlのLB液体培地で37℃、一晚培養後、プラスミドを抽出した。抽出されたプラスミドは Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.2 (Perkin-Elmer)とmodel 3700 DNA sequenc

er (Perkin-Elmer)を用い付属のプロトコールに従って塩基配列(部分配列)の決定を行った。決定されたDNA配列はBlast (Altschul and Lipman, 1990)を用いホモロジー検索を行いフィトエンデサチュラーゼ(phytoene desaturase)遺伝子(crtI)とホモロジーを持つDNA断片であることを確認した。また、PCR後、精製されたDNA断片の一部は実施例6、7に示すコロニーハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーションのプロープとして用いた。

Altschul, S. F. and Lipman, D. J., Protein database search for multiple alignments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5509-5513, 1990.

[実施例5] コスミドライブラリーの作製

ブレバンディモナス属SD-212株の染色体DNAの調製液からファージ粒子を得るところまでの実験方法はStratagene社のSuperCos 1 Cosmid Vector Kitの取扱説明書に従って行った。すなわちブレバンディモナス属SD-212株から得られた染色体DNAをSau3AIで部分消化を行いコスミドベクターのBamHI部位に連結し、LAMBDA INN (Nippon Gene)を用いてファージ粒子にパッケージングした。そして、大腸菌 (*Escherichia coli*) XL1-Blue MR株に、そのファージを感染させ、抗生物質Ap耐性のコロニーを、Apを含むLBプレート上に約1,000個得た。得られたコロニーは滅菌した楊枝を用いて、新たに抗生物質を含むLBプレート上に植え継いだ。このコスミドベクターSuperCos 1は7.9 kbのベクターで、30~45 kbのDNA断片を挿入することができる。

[実施例6] コロニーハイブリダイゼーション

実施例5で作製した大腸菌XL1-Blue MRを宿主として作製したコスミドライブラリー500コロニーを用いて、実施例4で示したPCR法により増幅したフィトエンデサチュラーゼ遺伝子(crtI)の部分断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション(colony hybridization)法を行い、crtI遺伝子を含むクローンのスクリーニングを行った。まず、大腸菌をプレート上に植え37℃で培養した。このとき、大腸菌は一枚のプレートあたり、48コロニーずつ植え付けた。一晚培養後、直径82 mmのHybond-N+メンブレン(Amersham Pharmacia)をプレートに乗せ、注射針で目印をつけた。メンブレンをはがし、菌体が付着した面を上に向け、10% SDS溶液を含んだ3 mmろ紙(Whatman)で5分間インキュベート後、さらに変性溶液(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)を含んだ3 mmろ紙

で5分間インキュベートを行い、その後メンブレンを中和液(1.5 M NaCl, 0.5M Tris・HCl)に5分間つけた(2回)。さらに2×SSCで2回洗浄した。このとき、細胞の破片を残さないようにキムタオルでメンブレンを強くこすった。処理後、メンブレンは、キムタオル、キムワイプ上で30分間風乾後、80℃で2時間ベーキング(baking)を行い、メンブレンにDNAを固定した。プローブDNAは、Alkphos Direct Labeling and Detection System (Amersham Pharmacia)を用いて作製し、添付のプロトコールに従って、コロニーハイブリダイゼーションを行った。その結果、500株のクローンから、フィトエンデサチュラーゼ遺伝子(*crtI*)の部分断片をプローブとして用いたコロニーハイブリダイゼーション法により6個のポジティブクローンが得られた。6個のポジティブクローンに存在するプラスミドを、pCos5-1、pCos5-2、pCos7-1、pCos8-1、pCos9-1、pCos10-1と名づけた。

〔実施例7〕 サザンハイブリダイゼーション

実施例6で選抜された、6つのポジティブクローンを、Apを添加した2 mlのLB液体培地で37℃、一晚培養した後、プラスミドDNAを抽出した。抽出後のプラスミドDNAは、*Eco*RIで完全消化した後、電気泳動を行った。その後0.4M NaOH溶液を用いてキャピラリーブロッティングを行うことによりナイロンメンブレン(Hybond N+)にトランスファーした。処理後、メンブレンを80℃で2時間、ベーキング(baking)を行い、メンブレンにDNAを固定した。その後、Alkphos Direct Labeling and Detection System (Amersham Pharmacia)を用い、添付のプロトコールに従って、サザンハイブリダイゼーションを行った。また、プローブには、前述したフィトエンデサチュラーゼ遺伝子(*crtI*)の部分断片をプローブとして用いた。その結果、6つのポジティブクローンのうちpCos5-2、pCos7-1、pCos9-1の3つのクローンにおいて、12 kbの*Eco*RI断片にポジティブシグナルが認められた。

〔実施例8〕 カロテノイド遺伝子群の解析

実施例7で選抜された陽性クローンの1つ(pCos5-2)を用い、12 kbの挿入断片を*Eco*RIで切り出し、プラスミドベクターpBluescript II KS-の*Eco*RI部位に連結し、大腸菌(*E. coli*) DH5 α 株を形質転換した。このプラスミドをp5Bre2-15と名づけた。この大腸菌を、Apを添加した2 mlのLB液体培地で37℃、一晚培養後、プラスミドを抽出した。抽出されたプラスミドはBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ve

r.2 (Perkin-Elmer)とmodel 3700 DNA sequencer (Perkin-Elmer)を用い付属のプロトコールに従って塩基配列の決定を行った。決定された11,991 bpのDNA配列はGene Mark.hmm (Lukashin A. and Borodovsky M.)を用い遺伝子コード領域を推定し、SD様配列の確認などを行い、12 kbの断片中に12個のORF (open reading frame)を発見した(図2)。Blastを用い、各ORFのアミノ酸配列レベルでのホモロジー検索を行い、12個のうち7個は、既知のカロテノイド生合成遺伝子(crtW, crtY, crtI, crtB, crtE, crtZ, idi)と相同性を示していたので(表2)、同様に、crtW, crtY, crtI, crtB, crtE, crtZ, idi遺伝子と名づけた。残りの5個の遺伝子は、既存のどんな遺伝子とも全体的な相当性は有さない未知遺伝子であった。

プラスミドp5Bre2-15を有する大腸菌は受託番号P-19580として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。

[0062] [表2]

Brevundimonas 属 SD-212株のカロテノイド生合成遺伝子群に存在する各種ORFの特徴と機能の推定

ORF 名	GC%	アミノ酸残基数	予想される機能	その他生物の遺伝子産物との相同性 (%)	GenBank number
ORF1	69.7	140	未知		
<u>crtW</u>	69.6	244	β -カロテン C4オキシゲナーゼ	CrtW: <i>Brevundimonas aurantiaca</i> (96)	AAN86030
<u>crtY</u>	70.2	392	リコペンシクラーゼ	CrtY: <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 (53)	AF408848
<u>crtI</u>	67.3	489	フィエンテ'サチュラーゼ	Crt I: <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 (72)	AF408848
<u>crtB</u>	72	310	フィエンシンターゼ	CrtB: <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 (54)	AF408848
ORF6	75.8	355	未知		
ORF7	74.6	315	未知		
<u>crtE</u>	71	298	GGPP シンターゼ	CrtE: <i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2 (42)	AF408847
<u>idi</u>	74.9	350	Type II IPP イソメラーゼ	IPP イソメラーゼ: <i>Pantoea agglomerans</i> Eho10 (55)	Q01335
<u>crtZ</u>	66.9	161	β -カロテン C3 ヒドロキシラーゼ	CrtZ: <i>Alcaligenes</i> sp. PC1 (49)	Q44262
ORF11	70.7	257	未知		
ORF12	66.7	122	未知		

CrtW, *Brevundimonas aurantiaca* (GenBank number AAN86030); CrtY, CrtI, CrtB, CrtE, *Xanthobacter* sp. Py2 (GenBank no. AF408848, AF408847); IPP isomerase, *Pantoea agglomerans* Eho10 (*Erwinia herbicola*) (GenBank no. Q01335); CrtZ, *Alcaligenes* sp. PC1 (GenBank no. Q44262)

Lukashin A. and Borodovsky M., 1998, GeneMark.hmm: new solutions for gene finding, NAR, Vol. 26, No. 4, pp. 1107-1115.

Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. and Harashima, K., Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. 172,

6704-6712, 1990

Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T., and Miki, W., Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol. 177, 6575-6585, 1995 (非特許文献1)

Hannibal, L., Lorquin, J., D'Ortoli, N.A., Garcia, N., Chaintreuil, C., Masson-Boivin, C., Dreyfus, B. and Giraud, E., Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium Bradyrhizobium sp. strain ORS 278. J. Bacteriol. 182, 3850-3853, 2000

Larsen, R.A., Wilson, M.M., Guss, A.M. and Metcalf, W.W., Genetic analysis of pigment biosynthesis in Xanthobacter autotrophicus Py2 using a new, highly efficient transposon mutagenesis system that is functional in a wide variety of bacteria Arch. Microbiol. 178, 193-201, 2002

ブレバンディモナス属SD-212株のcrtW遺伝子によりコードされる酵素CrtWは244アミノ酸からなるペプチドであり、そのアミノ酸配列は配列番号2に、crtW遺伝子の塩基配列とコードされるアミノ酸配列は配列番号1に示されている。ブレバンディモナス属SD-212のCrtWは、パラコッカス属N81106株のCrtW (DDBJ/Genbank accession no. D58420) 及びパラコッカス属PC-1株のCrtW (DDBJ/Genbank accession no. D58422) とアミノ酸配列レベルで、両方とも46%の同一性(identity)しか示さなかった。なお、表2において、ブレバンディモナス属SD-212株のCrtWは、Brevundimonas aurantiacaのCrtWと96%の相同性(同一性)があることがわかるが、後者の配列はそれのみがネット上にのみ公開されているものであり、この酵素の機能や性質は全く不明であった。
[実施例9] β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質発現用プラスミドの構築

大腸菌ベクターpUC18 (TOYOBO) のコードする β -ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)のリード配列との融合タンパク質となるように各crtW遺伝子をPCRで増幅し、 β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質発現用の各種プラスミドの構築を行った。具体的には、プラスミド

p5Bre2-15、pPC17、及び、pAK96Kを鋳型DNAとして用い、5'末端側にEcoRI部位を

、3'末端側にBamHI部位を有する各crtW増幅産物が得られるように設計された配列番号(3~8)のプライマーを用いたPCRにより、目的とするDNA断片を増幅した。なお、pPC17、及び、pAK96Kはそれぞれ、パラコッカス属PC-1株、及びパラコッカス属N81106由来のcrtW遺伝子を含むプラスミドである。

耐熱性DNAポリメラーゼはPfuTurbo Hotstart DNA Polymerase (Stratagene)を用い、各々95℃で20秒間熱変性後、95℃で20秒、51℃で30秒、72℃で1分30秒の条件で30サイクルの増幅を行った。増幅産物の一部は、1%アガロースゲル電気泳動で確認した。残りの増幅産物はエタノール沈殿後、EcoRIによる消化と、BamHIによる消化を行い、1%アガロースゲル電気泳動を行った。次に目的の長さのDNAをアガロースゲルから切り出し、精製(Gene Clean Turbo Kit、Q-BIOgene)を行った。切り出されたDNAはpUC18のEcoRIとBamHI部位に連結し、大腸菌JM109に形質転換した。このβ-ガラクトシダーゼ融合タンパク質発現用プラスミドでは、各CrtWの本来の開始のアミノ酸配列Metの前に、β-ガラクトシダーゼの7個のアミノ酸からなるリーダ配列MetThrMetIleThrAsnSerが付加されるようにデザインされている。

[実施例10] ゼアキサンチン及びアスタキサンチン産生大腸菌の構築

各crtW遺伝子を含むプラスミドを有する大腸菌を、Apを添加した4 mlのLB液体培地で37℃、一晚培養後、プラスミドを抽出した。抽出されたプラスミドはBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.2 (Perkin-Elmer)とmodel 3700 DNA sequencer (Perkin-Elmer)を用い付属のプロトコールに従って塩基配列の確認を行った。正しい塩基配列が確認されたブレバンディモナス属SD-212株、パラコッカス属PC-1株、及び、パラコッカス属N81106株由来のcrtW遺伝子を有する各プラスミドの名前を、それぞれpUCBreW (lacZ::crtW)、pUCParaPC1W (lacZ::crtW)、pUCParaN8W (lacZ::crtW)と名づけた。プラスミドpACCAR25 Δ crtXを大腸菌JM109に導入し、Cm耐生コロニーを選択することによりゼアキサンチン産生大腸菌を構築した。また、プラスミドpACCAR25 Δ crtXとpUCBreW、pUCParaPC1WあるいはpUCParaN8Wを共に大腸菌に導入し、Ap及びCm耐生コロニーを選択することによりアスタキサンチン産生大腸菌を構築した。それぞれ、JM109Ercrt-zea、JM109BreW-asta、JM109ParaPC1W-asta及びJM109ParaN8W-astaと名づけた。

〔実施例11〕各crtW遺伝子を発現した大腸菌におけるアスタキサンチン生産効率の解析

JM109Ercrt-zeaはCmを添加した4 mlのLB液体培地で、JM109BreW-asta、JM109 ParaPC1W-asta及びJM109ParaN8W-asta はそれぞれAp及びCmを添加した4 mlのLB液体培地で37℃、一晩前培養し、50 μ lを4 mlのLB液体培地で植菌し、30℃で本培養した。A₆₀₀ = 約0.5 になった時に、0.5 mMのIPTG (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド)を添加し、さらに30℃で培養した。培養液は遠心分離により集菌し、菌体をSTEで二回洗浄後、400 μ lのアセトンを添加し、ボルテックすることにより色素を菌体からアセトンへ移した。その後、遠心分離を行い、上清をろ過し、HPLC-PDAシステム (Waters Alliance 2695および2996フォトダイオードアレイ検出器) またはHPLC-PDA-MSシステム (資生堂Nano Space SI-2およびThermoQuest LCQ advantage) で色素の分析を行った。HPLC-PDAのカラムにはTSK gel ODS-80Ts (TOSOH)を用い、送液条件は、A液 (95%メタノール)、B液 [メタノール:テトラヒドロフラン (tetrahydrofuran; THF), 7 : 3]を用い、1.0 ml/minの流速で、5分間A液100%を送液し、5分から10分の間 A液 100 %からB液 100 % に直線グラジエントを行い、その後B液を8分間送液した。なお、検出はフォトダイオードアレイ検出器で行い、付属のEmpowerソフトウェアで解析を行った。HPLC-PDA-MSのカラムはC30カラムである野村化学社製Deverosil C30-UG-3 (1.0 mm i.d. x 150 mm)を用い、プレカラムとしてDeverosil C30-UG-Sを用いた。送液条件は、A液 (95%メタノール)、B液 [メタノール:tert-ブチルメチルエーテル (tBME), 3 : 7]を用い、0.09 ml/minの流速で、15分間A液100%を送液し、15分から115分の間でA液 100 %からB液 100 % に直線グラジエントを行い、その後B液を20分間送液した。

IPTG添加後48時間後における各種大腸菌が生産した色素のHPLC-PDAシステムおよびHPLC-PDA-MSシステムによる色素分析を行った (図3参照)。その結果、JM109Ercrt-zeaが生産する色素は、ほとんどすべて、ゼアキサンチン (zeaxanthin) (HPLC/PDA、RT 8.5 min、 λ max 450、479 nm; HPLC/PDA/MS、RT 25.55 min、 λ max 450、476 nm、m/z 569.2 [M+H]⁺) であった (図3a)。JM109BreW-astaでは、主要色素のアスタキサンチン (astaxanthin) (HPLC/PDA、RT 5.8 min、 λ max 473nm; HPL

C/PDA/MS、RT 13.28, λ max 476 nm、 m/z 597.2 $[M+H]^+$)の他に、アドニルビン(adonirubin; Poenicoxanthin) (HPLC/PDA、RT 8.1 min; HPLC/PDA/MS、RT 20.92 min、 λ max 469 nm、 m/z 581.2 $[M+H]^+$)、3'-ヒドロキシエキネノン(3'-hydroxyechinenone) (HPLC/PDA、RT 11.5 min、 λ max 473; HPLC/PDA/MS、RT 62.10 min、 λ max 469、 m/z 567.2 $[M+H]^+$)、3-ヒドロキシエキネノン(3-hydroxyechinenone) (HPLC/PDA、RT 11.7 min; HPLC/PDA/MS、RT 62.72 min、 m/z 567.2 $[M+H]^+$)、リコペン(lycopene) (HPLC/PDA、RT 13.4 min、 λ max 446、473、505 nm; HPLC/PDA/MS、RT 90.27 min、 λ max 444、471、501 nm、 m/z 537.1)のピークが観察された(図3b)。JM109ParaPC1W-astaとJM109ParaN8W-astaでは、上記のカロテノイドに加えて、アドニキサンチン(adonixanthin) (HPLC/PDA: RT 7.6 min; HPLC/PDA/MS: RT 17.45 min、 λ max 460、482 nm、 m/z 583.2 $[M+H]^+$)のピークが観察された(図3c及びd)。JM109BreW-asta、JM109ParaPC1W-asta及びJM109ParaN8W-astaにおいて蓄積したカロテノイド中のアスタキサンチンの含量はそれぞれ、75%、65%および47%であり、JM109BreW-astaのアスタキサンチンの含量が一番高かった(図3)。また、JM109BreW-asta、JM109ParaPC1W-asta、JM109ParaN8W-astaのいずれの組換え大腸菌の色素抽出液においても、3'-ヒドロキシエキネノンが蓄積する傾向が見られ、組換え大腸菌間で差異は認められなかった。一方、JM109BreW-astaの色素抽出液では、JM109ParaPC1W-asta及びJM109ParaN8W-astaの色素抽出液で見られたアドニキサンチンのピークが見られないことから、アドニキサンチンからアスタキサンチンへの変換効率が高く、結果としてアスタキサンチンの生産効率がよいことが予想された。そのことをさらに確認するために、アスタキサンチンの培養時間による生成効率を調べた。IPTG添加後 10, 17, 24時間後に大腸菌を回収し、蓄積した色素の分析を行った(図4)。定常期(stationary phase)までのJM109BreW-asta(図中の記号: ◆)のアスタキサンチンの生合成効率がJM109ParaPC1W-asta(図中の記号: ■)とJM109ParaN8W-asta(図中の記号: ▲)に比べ、顕著に高く、死滅期(death phase)に入るとその差は少しずつ縮まる傾向があった。

さらに、JM109ParaPC1W-astaとJM109ParaN8W-astaではアドニキサンチンが蓄積するがJM109BreW-astaではアドニキサンチンの蓄積が認められない傾向は全培養

期間で観察された。特に、6時間後の色素分析の結果では、JM109ParaPC1W-astaとJM109ParaN8W-astaではアドニキサンチンが多く(アスタキサンチンと同じくらい)蓄積されたが(図5b及びc)、JM109BreW-astaはアドニキサンチンの蓄積が全く見られず、その分、アスタキサンチンの生成量が増えていた(図5a)。

本研究により、ブレバンディモナス属SD-212株 (*Brevundimonas* sp. SD212) 由来のCrtWはアドニキサンチン (adonixanthin) からアスタキサンチン (astaxanthin) への変換効率が高く、最も効率的にアスタキサンチンを生産することが示された。これらの結果は、産業的利用を目的としたアスタキサンチンやその代謝物(アスタキサンチンエステル体等)の組換え微生物や組換え植物による大量生産に、ブレバンディモナス属SD-212株由来のcrtW遺伝子が有効であることを示している。

〔実施例12〕菌株、プラスミド、生育条件

本発明(crtZ)に用いられた菌株とプラスミドを表3に示す。菌株の培養は37℃あるいは30℃でLB (Luria-Bertani) 培地を用いて行った。必要に応じて、アンピシリン (ampicillin; Ap, 100 μ g/ml) または、クロラムフェニコール (chloramphenicol; Cm, 30 μ g/ml) を培地に添加した。

[0063] [表3]

本発明に用いた菌株とプラスミド

菌株/プラスミド	性質*	文献/発元
菌株		
E. coli JM109	遺伝子操作実験用宿主	Takara
JM109Pancr1-Cantha	pAC-Canthaを大腸菌JM109に導入したもの	本発明
JM109BreZ-asta	pAC-CanthaとpUCBreZをJM109に導入したもの	本発明
JM109PanZ-asta	pAC-CanthaとpUCpanZをJM109に導入したもの	本発明
JM109ParaPC1Z-asta	pAC-CanthaとpUCParaPC1ZをJM109に導入したもの	本発明
JM109ParaN8Z-asta	pAC-CanthaとpUCParaN8ZをJM109に導入したもの	本発明
JM109P99Z-asta	pAC-CanthaとpUCP99ZをJM109に導入したもの	本発明
プラスミド		
pAC-Cantha	Cm ^r , catE, catB, catI, catY, catWを含むプラスミド	Nishida et al. unpublished Data
pUC18	Ap ^r , クローニングベクター	TOYOBO
pUC8	Ap ^r , クローニングベクター	TOYOBO
p5Bre2-15	Ap ^r , <i>Brevundimonas</i> sp. SD-212 (MBIC03018)株由来の12kbのDNA断片がpBluescript II KS-のEcoRI部位に挿入されたもの	本発明
pCAR25	Ap ^r , <i>Pantoea ananatis</i> 20D3 (D90087)株由来の8.9kbのDNA断片がpUC19のKpn IとHind III部位に挿入されたもの	Misawa et al. 1990
pPC17	Ap ^r , <i>Paracoccus</i> sp. PC1 (MBIC03024)株由来の1.63kbのDNA断片がpBluescript II SK+のPst IとPst II部位に挿入されたもの	Misawa et al. 1995
AK98K	Ap ^r , <i>Paracoccus</i> sp. N81106 (MBIC01143)株由来の1.88kbのDNA断片がpBluescript II SK-のBamHIとKpn I部位に挿入されたもの	Misawa et al. 1995
pBS606	Ap ^r , <i>Flavobacterium</i> sp. P99-3 (AB106143)株由来の8.9kbのDNA断片がpBluescript II SK-のBgl IIとSal I部位に挿入されたもの	Teramoto et al. 2003
pUCBreZ	Ap ^r , <i>Brevundimonas</i> sp. SD-212 (MBIC03018)株由来の β -carotene hydroxylaseをPCRで増幅し、pUC18に挿入したもの	本発明
pUCPanZ	Ap ^r , <i>Pantoea ananatis</i> 20D3 (D90087)株由来の β -carotene hydroxylaseをPCRで増幅し、pUC18に挿入したもの	本発明
pUCParaPC1Z	Ap ^r , <i>Paracoccus</i> sp. PC1 (MBIC03024)株由来の β -carotene hydroxylaseをPCRで増幅し、pUC18に挿入したもの	本発明
pUCParaN8Z	Ap ^r , <i>Paracoccus</i> sp. N81106 (MBIC01143)株由来の β -carotene hydroxylaseをPCRで増幅し、pUC18に挿入したもの	本発明
pUCP99Z	Ap ^r , <i>Flavobacterium</i> sp. P99-3 (AB106143)株由来の β -carotene hydroxylaseをPCRで増幅し、pUC8に挿入したもの	本発明

* Ap^r, ampicillin耐性, Cm^r, chloramphenicol耐性

Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., and Harashima, K. 1990. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172: 6704-6712

Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwar, S., Saito, T., Ohtani, T., and Miki, W. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol. 177: 6575-6585: 非特許文献1

Teramoto, M., Takaichi, S., Inomata, Y., Ikenaga, H., and Misawa, N. 2003. Structural and functional analysis of a lycopene β -monocyclase gene isolated from a unique marine bacterium that produces myxol. FEBS Lett. 545: 120-126

[実施例13] β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質発現用プラスミドの構築

大腸菌ベクターpUC18あるいはpUC8 (TOYOBO) のコードする β -ガラクトシダーゼ

遺伝子 (*lacZ*) のリード配列との融合タンパク質となるように各 *crtZ* 遺伝子をPCRで増幅し、 β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質発現用の各種プラスミドの構築を行った。具体的には、プラスミド p5Bre2-15、pCAR25、pPC17、pAK96K、および、pBS606 を鋳型DNAとして用い、5' 末端側に *EcoRI* 部位を、3' 末端側に *Bam*HI 部位を (p5Bre2-15、pCAR25、pPC17、pAK96K)、あるいは5' 末端側に *Sma*I 部位を、3' 末端側に *Hind*III 部位を (pBS606) を有する各 *crtZ* 増幅産物が得られるように設計された配列番号 (11 ~ 20) のプライマーを用いたPCRにより、目的とするDNA断片を増幅した。なお、pCAR25、pPC17、pAK96K、および、pBS606 はそれぞれ、パントエア・アナナチス20D3株 [*Pantoea ananatis* (旧名: *Erwinia uredovora*)]、パラコッカス属 (*Paracoccus* sp.) PC-1 株、パラコッカス属 (*Paracoccus* sp.) N81106 株、およびフラボバクテリウム属 (*Flavobacterium* sp.) P99-3 株由来の *crtZ* 遺伝子を含むプラスミドである。

耐熱性DNAポリメラーゼはPfuTurbo Hotstart DNA Polymerase (Stratagene)を用い、各々95℃で20秒間熱変性後、95℃で20秒、51℃で30秒、72℃で1分30秒の条件で30サイクルの増幅を行った。増幅産物の一部は、1%アガロースゲル電気泳動で確認した。残りの増幅産物はエタノール沈殿後、*EcoRI*と*Bam*HIによる消化を行い (p5Bre2-15、pCAR25、pPC17、pAK96Kを鋳型とした場合)、または、*Sma*Iと*Hind*IIIによる消化を行い (pBS606を鋳型とした場合)、1%アガロースゲル電気泳動を行った。次に目的の長さのDNAをアガロースゲルから切り出し、精製 (Gene Clean Turbo Kit、Q-BIOgene) を行った。切り出されたDNAはpUC18の*EcoRI*と*Bam*HI部位に、あるいはpUC8の *Sma*Iと*Hind*III部位に連結し、大腸菌JM109に形質転換した。この β -ガラクトシダーゼ融合タンパク質発現用プラスミドでは、各 *CrtZ* の本来の開始のアミノ酸配列Metの前に、 β -ガラクトシダーゼの7個または9個のアミノ酸からなるリーダ配列MetThrMetIleThrAsnSer (p5Bre2-15、pCAR25、pPC17、pAK96Kを鋳型とした場合) あるいはMetThrMetIleThrAsnSerArgGly (pBS606を鋳型とした場合) が付加されるようにデザインされている。

[実施例14] カンタキサンチン及びアスタキサンチン産生大腸菌の構築

各 *crtZ* 遺伝子を含むプラスミドを有する大腸菌を、Apを添加した4 mlのLB液体培地で37℃、一晚培養後、プラスミドを抽出した。抽出されたプラスミドはBig Dye Termina

tor Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.2 (Perkin-Elmer)とmodel 3700 DNA sequencer (Perkin-Elmer)を用い付属のプロトコールに従って塩基配列の確認を行った。正しい塩基配列が確認されたブレバンディモナス属 (*Brevundimonas* sp.) SD-212株、パントエア・アナナチス (*Pantoea ananatis*) 20D3株、パラコッカス属 (*Paracoccus* sp.) PC1株、パラコッカス属 (*Paracoccus* sp.) N81106株、および、フラボバクテリウム属 (*Flavobacterium* sp.) P99-3株由来の *crtZ* 遺伝子を有する各プラスミドの名前を、それぞれ pUCBreZ、pUCPanZ、pUCParaPC1Z、pUCParaN8Z、pUCP99Z と名づけた。プラスミド pAC-Cantha を大腸菌 JM109 に導入し、Cm 耐生コロニーを選択することによりカンタキサンチン産生大腸菌 (JM109Pancrt-Cantha と呼ぶ) を構築した。また、プラスミド pAC-Cantha と、pUCBreZ、pUCPanZ、pUCParaPC1Z、pUCParaN8Z あるいは pUCP99Z を共に大腸菌に導入し、Ap 及び Cm 耐生コロニーを選択することによりアスタキサンチン産生大腸菌を構築した。それぞれの大腸菌形質転換体を、JM109BreZ-asta、JM109PanZ-asta、JM109ParaPC1Z-asta、JM109ParaN8Z-asta、及び JM109P99Z-asta と名づけた。

〔実施例15〕各 *crtZ* 遺伝子を発現した大腸菌におけるアスタキサンチン生産効率の解析

JM109Pancrt-Cantha は Cm を添加した 4 ml の LB 液体培地で、JM109BreZ-asta、JM109PanZ-asta、JM109ParaPC1Z-asta、JM109ParaN8Z-asta 及び JM109P99Z-asta はそれぞれ Ap 及び Cm を添加した 4 ml の LB 液体培地で 37℃、一晩前培養し、50 μ l を 4 ml の LB 液体培地で植菌し、30℃ で本培養した。A₆₀₀ = 約 0.5 になった時に、0.5 mM の IPTG (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) を添加し、さらに 30℃ で培養した。培養液は遠心分離により集菌し、菌体を STE で二回洗浄後、400 μ l のアセトンを追加し、ボルテックすることにより色素を菌体からアセトンへ移した。その後、遠心分離を行い、上清をろ過し、HPLC-PDA システム (Waters Alliance 2695 および 2996 フォトダイオードアレイ検出器) で色素の分析を行った。HPLC-PDA のカラムには TSK gel OD S-80Ts (TOSOH) を使い、送液条件は、A 液 (95% メタノール)、B 液 [メタノール: テトラヒドロフラン (tetrahydrofuran; THF), 7 : 3] を使い、1.0 ml/min の流速で、5 分間 A 液 100% を送液し、5 分から 10 分の間 A 液 100% から B 液 100% に直線グラジエントを行い

、その後B液を8分間送液した。なお、検出はフォトダイオードアレイ検出器で行い、付属のEmpowerソフトウェアで解析を行った。

IPTG添加後48時間後における各種大腸菌が生産した色素のHPLC-PDAシステムによる色素分析を行った(図6参照)。その結果、JM109Pancrt-Canthaが生産する色素は、ほとんどすべて、カンタキサンチン(canthaxanthin) (RT 10.2 min、 λ max 478 nm)であった(図6a)。JM109BreZ-asta、JM109PanZ-asta、JM109ParaPC1Z-asta、JM109ParaN8Z-astaでは、主要色素のアスタキサンチン(astaxanthin) (RT 5.7 min、 λ max 476nm)の他に、アドニキサンチン(adonixanthin) (RT 7.2 min、 λ max 463 nm)のピークが観察された(図6b、c、d、及びe)。JM109P99Z-astaでは、カンタキサンチン(canthaxanthin)、アドニルビン(adonirubin; Poenicoxanthin) (RT 8.6 min、 λ max 470)が主要色素であった(図6f)。また、図7に示すように、JM109BreZ-asta(図中の記号: ◆)、JM109PanZ-ast(図中の記号: □)a、JM109ParaPC1Z-asta(図中の記号: ▲)、JM109ParaN8Z-asta(図中の記号: ▼)及びM109P99Z-asta(図中の記号: ●)において蓄積したカロテノイド中のアスタキサンチンの含量は全培養期間中JM109BreZ-ast aが一番高く、48時間後はそれぞれ、42%、29%、21%、17%および4%であった。

本研究により、ブレバンディモナス属SD-212株(*Brevundimonas* sp. SD212)由来のCrtZは、最も、効率的にアスタキサンチンを生産することが示された。これらの結果は、産業的利用を目的としたアスタキサンチンやその代謝物(アスタキサンチンエステル体等)の組換え微生物や組換え植物による大量生産に、ブレバンディモナス属SD-212株由来のcrtZ遺伝子が有効であることを示している。

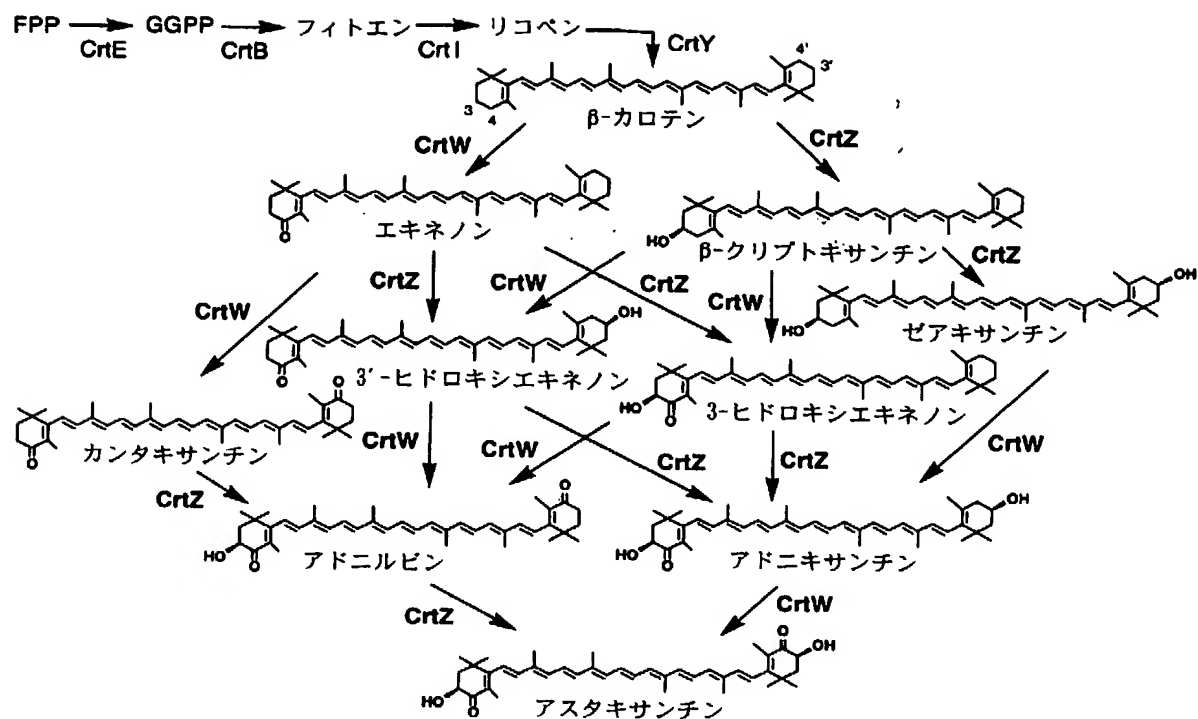
本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願(特願2004-166625号)の明細書および/または図面に記載されている内容を包含する。また、本発明で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

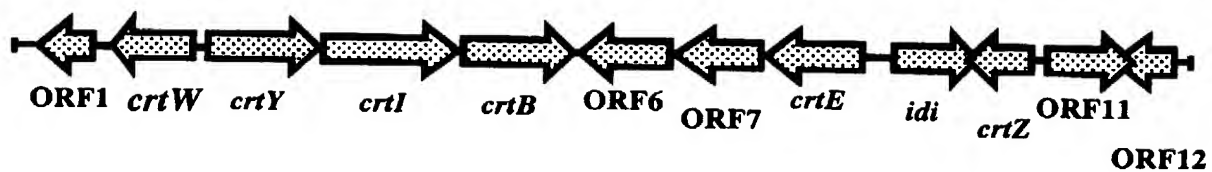
- [1] (a)配列番号2記載のアミノ酸配列からなるペプチド、(b)配列番号2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-4-ケトラゼ活性を有するペプチド、又は(c)配列番号1記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノン環-4-ケトラゼ活性を有するペプチドをコードする β -イオノン環-4-ケトラゼ遺伝子を導入して得られる微生物または植物であって、アスタキサンチンまたはその代謝物を合成できる微生物または植物。
- [2] β -イオノン環-4-ケトラゼ遺伝子を、他のカロテノイド生合成遺伝子とともに導入して得られる請求項1に記載の微生物または植物。
- [3] 他のカロテノイド生合成遺伝子が、ファルネシルピロリン酸から、3位が水酸化された β -イオノン環を有するカロテノイドを合成するのに必要とされる遺伝子群の全部又は一部であることを特徴とする請求項2に記載の微生物または植物。
- [4] 微生物が大腸菌であることを特徴とする請求項1乃至3に記載の微生物。
- [5] 請求項1乃至4に記載の微生物を、培地で培養して培養物又は菌体からアスタキサンチンまたはその代謝物を得ることを特徴とする、アスタキサンチンまたはその代謝物の製造法。
- [6] 請求項1乃至3に記載の植物を、栽培して植物体からアスタキサンチンまたはその代謝物を得ることを特徴とする、アスタキサンチンまたはその代謝物の製造法。
- [7] (d)配列番号10記載のアミノ酸配列からなるペプチド、(e)配列番号10記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつ β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチド、又は(f)配列番号9記載の塩基配列からなるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする細菌由来のペプチドであって、 β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ活性を有するペプチドをコードする β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ遺伝子を導入して得られる微生物または植物であって、アスタキサンチンまたはその代謝物を合成できる微生物または植物。

- [8] β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ遺伝子を、他のカロテノイド生合成遺伝子とともに導入して得られる請求項7に記載の微生物または植物。
- [9] 他のカロテノイド生合成遺伝子が、ファルネシルピロリン酸から、4位がケト化された β -イオノン環を有するカロテノイドを合成するのに必要とされる遺伝子群の全部又は一部であることを特徴とする請求項8に記載の微生物または植物。
- [10] 微生物が大腸菌であることを特徴とする請求項7乃至9に記載の微生物。
- [11] 請求項7乃至10に記載の微生物を、培地で培養して培養物又は菌体からアスタキサンチンまたはその代謝物を得ることを特徴とする、アスタキサンチンまたはその代謝物の製造法。
- [12] 請求項7乃至9に記載の植物を、栽培して植物体からアスタキサンチンまたはその代謝物を得ることを特徴とする、アスタキサンチンまたはその代謝物の製造法。

[図1]

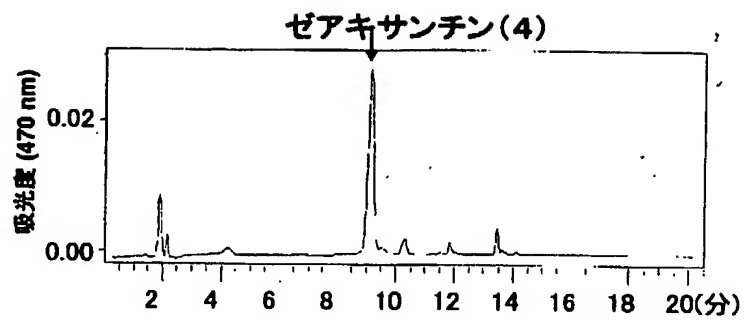


[図2]

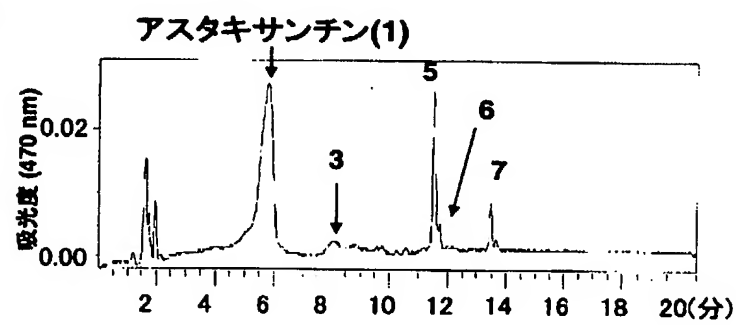


[図3]

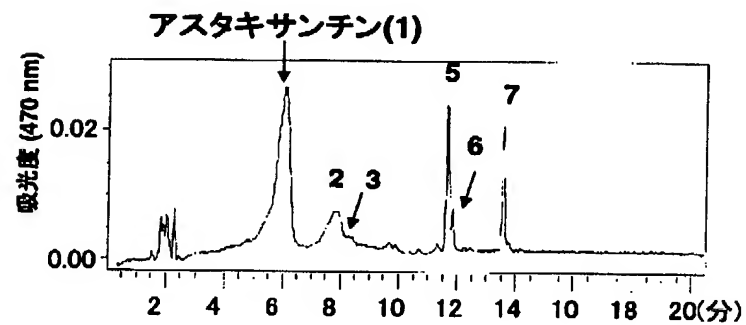
a



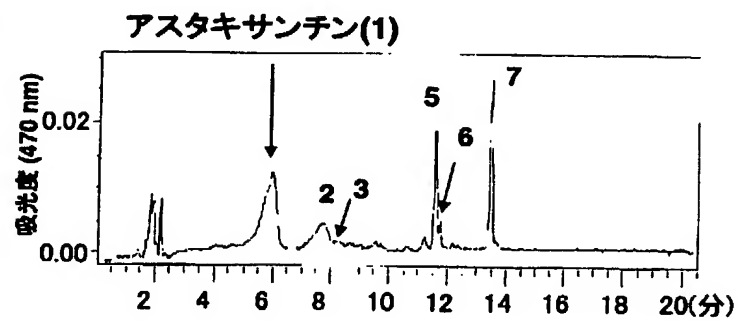
b



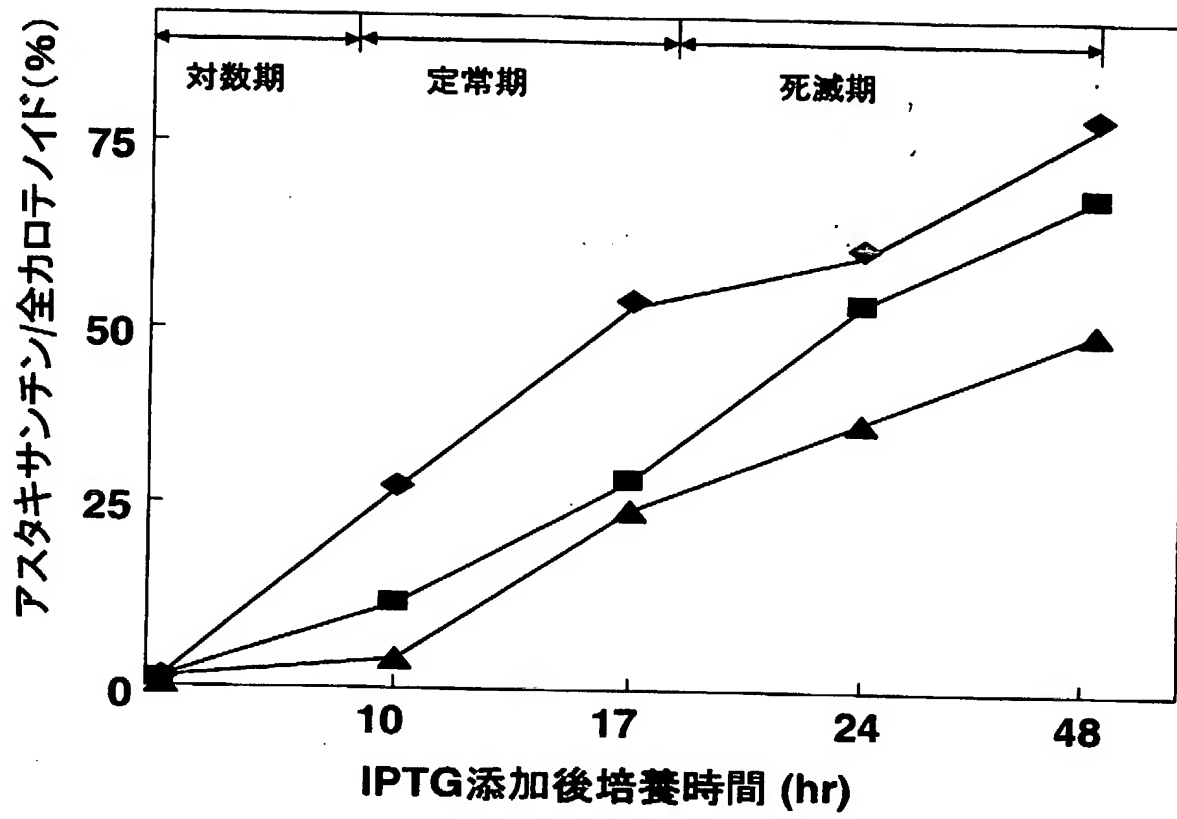
c



d

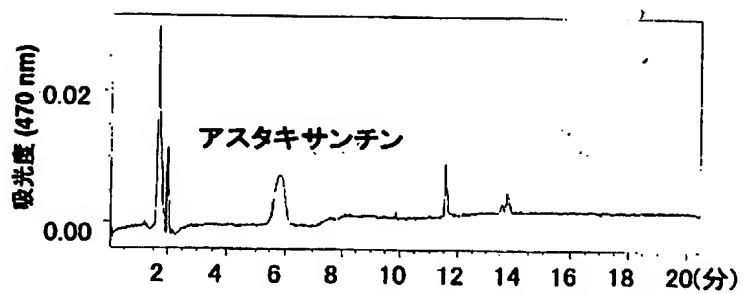


[図4]

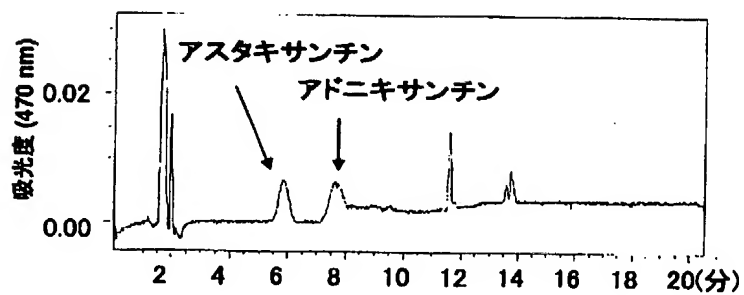


[図5]

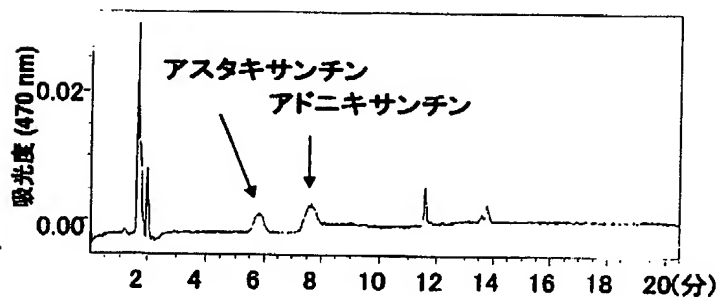
a



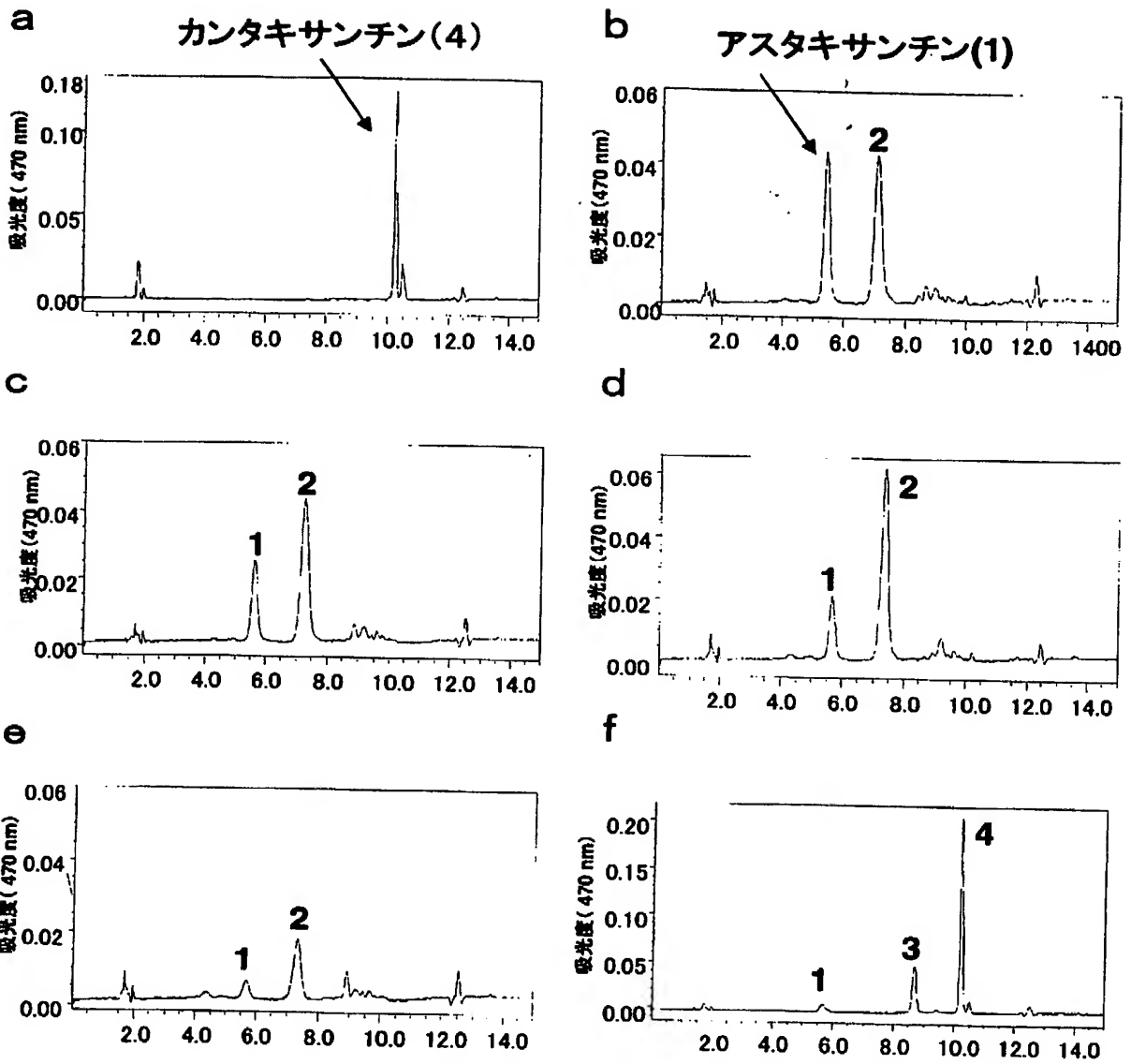
b



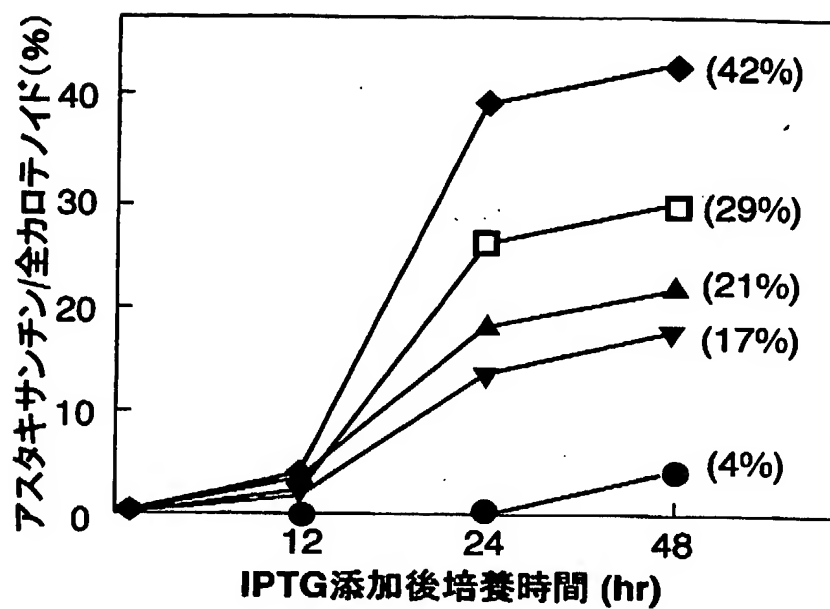
c



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/009609

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/31, 15/53, 1/21, A01H5/00, C12P23/00//C12N9/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/31, 15/53, 1/21, 9/02, A01H5/00, C12P23/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), AGLICOLA (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
Medline (STN), GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq, PIR/SwissProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 02/079395 A2 (Cargill Inc.), 10 October, 2002 (10.10.02), & CA 2436366 A1 & EP 1377598 A2 & JP 2004-528839 A & NO 2003/3353 A & US 2004/078846 A1	1-3, 5 1-6
Y	Yasuhiro NISHIDA et al., "Kaiyosei Saikin Brevundimonas sp. SD212 (MBIC 03018) no carotenoid Seigosei Idenshi Gun no Kozo to Kino Kaiseki ni tsuite -1-", Nihon Nogei Kagakukai 2004 Nendo Taikai Koen Yoshishu, 05 March, 2004 (05.03.04), page 137 (3A01p17)	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 September, 2005 (02.09.05)Date of mailing of the international search report
20 September, 2005 (20.09.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/009609

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Setsuo KOMEMUSHI et al., "Kaiyosei Saikin Brevundimonas sp. SD212 (MBIC 03018) no carotenoid Seigosei Idenshi Gun no Kozo to Kino Kaiseki ni tsuite -2-", Nihon Nogei Kagakukai 2004 Nendo Taikai Koen Yoshishu, 05 March, 2004 (05.03.04), page 137 (3A01p18)	1-6
Y	KAJIWARA, S. et al., Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from Haematococcus pluvialis, and astaxanthin synthesis in Escherichia coli., Plant Mol. Biol., 1995, Vol.29, pages 343 to 352	1-6
A	Stalberg K. et al., Synthesis of ketocarotenoids in the seed of Arabidopsis thaliana., Plant J., 2003, Vol.36, 771-779.	1-6
A	Mann V. et al., Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers., Nature Biotechnology, 2000, Vol.18, No.8, pages 888 to 892	1-6
A	WO 95/18220 A1 (Kirin Brewery Co., Ltd., Marine Biotechnology Institute Co., Ltd.), 06 July, 1995 (06.07.95), & EP 0735137 B1 & JP 3375639 B2 & US 5811273 A	1-6
A	WO 2004/017749 A2 (SUNGENE GMBH & CO. KGAA, BASF AG., BASF PLANT SCIENCE GMBH), 04 March, 2004 (04.03.04), & EP 1531683 A2	1-6
A	WO 2004/018693 A2 (SUNGENE GMBH & CO. KGAA), 04 March, 2004 (04.03.04), & EP 1532264 A2	1-6
A	WO 2004/018695 A2 (SUNGENE GMBH & CO. KGAA), 04 March, 2004 (04.03.04), & EP 1532266 A2	1-6
E,A	WO 2005/049643 A1 (Marine Biotechnology Institute Co., Ltd.), 02 June, 2005 (02.06.05), (Family: none)	1-6
P,A	Yoshie SAI et al., "Kaiyo Saikin Yurai no Kakushu β -carotene ketolase Idenshi (crtW) no Donyu ni yoru Daichokin deno astaxanthin Seisansei no Hyoka", Dai 7 Kai Japanese Society for Marine Biotechnology Taikai Koen Yoshishu, 17 June, 2004 (17.06.04), page 118 (AO-7),	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/009609

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The genes as set forth in claims 1 to 6 and 7 to 12 are common to each other in originating in a marine bacterium *Brevundimonas* sp. SD-212 strain and encoding an enzyme catalyzing a reaction in the astaxanthin synthesis system. However, the requirement of unity of invention cannot be satisfied merely because genes are obtained from the same origin. As reported by documents 1 to 3, genes encoding β -ionone ring-4-ketolase (CrtW) and β -ionone ring-3-hydroxylase (CrtZ) participating in the synthesis of astaxanthin had been publicly known before the filing of the present application. Therefore, it cannot be considered as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2 to provide genes encoding (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1 to 6.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/009609

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet (2)

enzymes that are common to each other exclusively in participating in synthesis of astaxanthin but having different catalytic activities. Such being the case, it is recognized that the present application have two groups of inventions corresponding respectively to CrtW and CrtZ. Document 1: WO 95/18220 A1, document 2: WO 02/079395 A2 and document 3: Biochim. Biophys. Acta, 1999, vol. 1446, p. 203-212.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2005/009609

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/31, 15/53, 1/21, A01H5/00, C12P23/00 // C12N9/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/31, 15/53, 1/21, 9/02, A01H5/00, C12P23/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、AGLICOA (DIALOG)、JSTPlus (JOIS)、Medline (STN)
GenBank/DBJ/EMBL/GeneSeq、PIR/SwissProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 02/079395 A2 (Cargill Incorporated) 2002.10.10 & CA 2436366 A1 & EP 1377598 A2 & JP 2004-528839 A & NO 2003/3353 A & US2004/078846 A1	1-3, 5 1-6
Y	西田康宏 他、 海洋性細菌 <i>Brevundimonas</i> sp. SD212 (MBIC 03018) の carotenoid 生合成遺伝子群の構造と機能解析について -1-、 日本農芸化学会 2004 年度大会講演要旨集、2004.03.05、 137 頁 (3A01p17)	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.09.2005

国際調査報告の発送日

20.9.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4B

3537

田村 明照

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式 PCT/ISA/210 (第2ページ) (2004年1月)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	米虫節夫 他、 海洋性細菌 <i>Brevundimonas</i> sp. SD212 (MBIC 03018) の carotenoid 生合成遺伝子群の構造と機能解析について -2-、 日本農芸化学会 2004 年度大会講演要旨集、2004.03.05、 137 頁 (3A01p18)	1-6
Y	Kajiwara S, et al., Isolation and functional identification of a novel cDNA for astaxanthin biosynthesis from <i>Haematococcus pluvialis</i> , and astaxanthin synthesis in <i>Escherichia coli</i> , <i>Plant Mol. Biol.</i> , 1995, vol. 29, p. 343-352.	1-6
A	Stalberg K, et al., Synthesis of ketocarotenoids in the seed of <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> , <i>Plant J.</i> , 2003, vol. 36, 771-779.	1-6
A	Mann V, et al., Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers., <i>Nature Biotechnology</i> , 2000, vol. 18 no. 8, p. 888-892.	1-6
A	WO 95/18220 A1 (麒麟麦酒株式会社、株式会社海洋バイオテクノロジー研究所) 1995.07.06 & EP 0735137 B1 & JP 3375639 B2 & US 5811273 A	1-6
A	WO 2004/017749 A2 (SUNGENE GMBH & CO. KGAA, BASF AKTIENGESELLSCHAFT, BASF PLANT SCIENCE GMBH) 2004.03.04 & EP 1531683 A2	1-6
A	WO 2004/018693 A2 (SUNGENE GMBH & CO. KGAA) 2004.03.04 & EP 1532264 A2	1-6
A	WO 2004/018695 A2 (SUNGENE GMBH & CO. KGAA) 2004.03.04 & EP 1532266 A2	1-6
E A	WO 2005/049643 A1 (株式会社海洋バイオテクノロジー研究所) 2005.06.02 (ファミリーなし)	1-6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	崔善江 他、 海洋細菌由来の各種 β -carotene ketolase 遺伝子(crtW)の導入による大腸菌での astaxanthin 生産性の評価、第7回マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集、2004.06.17、118 頁(A0-7)	1-6

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-6及び7-12に記載された遺伝子は、海洋細菌ブレバンディモナス属 (*Brevundimonas* sp.) SD-212株に由来していること、及び、アスタキサンチン合成系の反応を触媒する酵素をコードしている点で共通している。しかしながら、遺伝子が単に同じ起源から得られたという理由だけでは発明の単一性を満たさない。そして、アスタキサンチン合成に関与する β -イオノン環-4-ケトラゼ (CrtW) や β -イオノン環-3-ヒドロキシラーゼ (CrtZ) をコードする遺伝子は文献1-3に記載されるように本出願前から公知である。したがって、アスタキサンチン合成に関与することをもってのみ共通し、触媒活性の異なる酵素をコードする遺伝子を提供することは、PCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。よって本出願は、CrtW及びCrtZに対応する2個の発明を含むものと認められる。文献1: WO 95/18220 A1, 文献2: WO 02/079395 A2, 文献3: Biochim. Biophys. Acta, 1999, vol. 1446, p. 203-212.

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

1-6

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続表(2)) (2004年1月)